

C. 研究結果

1 年目は、中空バイオナノ粒子を脳に導入するための準備段階という位置づけで研究を行った。2年目は、実際にPTDを含んだナノ粒子の構築を行った。

上記のような研究方法により得られた結果から、

1. 「PTD の設計とモデルタンパク質の構築」では、リジンとトリプトファンを組み合わせた新規PTD配列を持ったPTD 3融合

タンパク質を構築することができた。

2. 「培養細胞を用いたPTD融合タンパク質の細胞内輸送の検証」では、構築したPTD 3融合タンパク質が効率良く細胞内にPTD融合タンパク質を導入でき、融合したタンパク質の機能を発揮できることが分かった。

3. 「動物実験での脳内輸送の検討」では、構築したPTD 3融合タンパク質をネズミの腹腔内に投与することで、血液脳関門を通過し、効率よくデリバリーされることがわ

かった。

4. 我々のグループで実際に検証して得られた上記の PTD の情報を基に、PTD 3 を組み込んだ L 粒子をコードした遺伝子の構築を行った。この遺伝子を中空バイオナノ粒子を生産するグループに提供し、その粒子の作成する PTD を持った中空バイオナノ粒子を用いて、次年度の研究を進めた。5. PTD を含んだ L タンパク質は構築できたものの、中空バイオナノ粒子としての融合がみられず、DDS 材料としてのナノ粒子として構築することができなかった。

6. PTD 付加中空バイオナノ粒子が構築できるか否かに関わらず、DDS としての中空バイオナノ粒子の体内動態を観察する必要があるため、生体イメージングによる評価系の構築を行った。

D. 考察

新規の PTD 配列を用いた PTD 融合タンパク質を全身投与で、脳に効率よく移行できた意義は大きいと考えられる。今後 PTD を融合させた中空バイオナノ粒子のデリバリー効率を検討することにより、細胞内ま

たは生体内で任意の組織、および脳に中空バイオナノ粒子内に納めた遺伝子、タンパク質、薬剤等をデリバリーすることが出来るように工夫することができると考えられ、新規 DDS を構築を試みたが、実際にナノ粒子を構築するステップで、PTD 配列の影響とおもわれる粒子形成阻害がみられ、ナノ粒子の構築ができなかった。他の PTD を付加することも考えたが、粒子形成阻害の原因を解明することができず、限られた研究期間で、ナノ粒子の完成まで達成することが困難と判断して、PTD 付加したナノ粒子の構築を断念せざる得なかった。引き続き、付加する PTD 配列の検討は続けるものの、残りの研究期間で中空バイオナノ粒子の DDS としての体内動態評価系の構築も重要な研究目的であったため、生体イメージング評価系の構築に重点を置いて研究を進めることとした。

(9) ピンポイント DDS 用バイオナノキャリアの機能評価のための蛍光半導体ナノ粒子の開発にむけて

A. 研究目的

ピンポイント DDS 用バイオナノキャリア開発の主目的は、薬剤・遺伝子・タンパク質などを体内の特性の細胞あるいは組織炎など標的とする臓器に高効率に導入する運搬体を開発することである。本研究で用いるキャリアは、B 型肝炎ウイルス表面抗原 (HBsAg) 粒子からウイルスゲノムを除去し、自己増殖性を喪失したタンパク質中空バイオナノ粒子である。このため粒子内部に薬剤・遺伝子・タンパク質などを封入し、静脈注射により、ヒト肝細胞に選択的に封入体を導入することが可能である。その導入効率の検討には、現在のところオワンクラゲ由来蛍光タンパク質やホタルルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を発現する遺伝子により実験的には確認されている。しかしながら実際に薬剤など目的とする物質を導入する際にはこれら遺伝子を導入するのは不相当であり、これらに代わる導入効率評価システムが要求されている。半導体ナノ粒子の研究開発は米国におけるナノテクノロジー研究の最重要課題の一つとされている量子サイズ効果 (Quantum Dot Effect) 理論に基づく新規な化合物で、粒子サイズにより発光色に変化し、発光強度と耐光性が既存の有機系蛍光色素をはるかに凌駕することが知られている。

そこで本研究では、蛍光半導体ナノ粒子の高輝度かつ長寿命な蛍光を用いて、目的とする物質の導入効率を低浸襲もしくは無浸襲的方法により定量的に解析することを目的として、蛍光ナノ粒子の導入を検討した。また、上記実験目的を完遂させるためには、ナノ粒子を生体への適応する条件と

もいえる、それ自体が毒性を有することがないように努めなければならない。ここではナノ粒子の生物応用において問題となりうる生物毒性についても併せて検討した。

B. 研究方法

1) 蛍光半導体ナノ粒子の表面加工

本研究に利用している半導体ナノ粒子はセレン化カドミウムを核としその外殻に硫化亜鉛を被覆した二重構造により構成されるコア・シェル型ナノ粒子である。この粒子はボトムアップ法と呼ばれる特殊なナノ粒子結晶成長によって合成される。逆ミセル物質 trioctylphosphine oxide (TOPO) を加熱し酸化カドミウムを溶融させた状態で、有機セレン化合物を同時に注入して結晶成長させる。分散した時に溶媒の温度が 270°C 程度の一旦低下するが、さらに加熱し 300°C にて一定に保つと、TOPO 溶媒内で半導体ナノ粒子が自己組織化する事により生成され、その結晶成長は反応温度と時間に依存する。

上記方法で合成された蛍光ナノ粒子は、その表面が TOPO など疎水性化合物でコートされた状態である。これを化学分野に適応するためには親水性物質により表面を交換し水溶性のナノ粒子を得る必要がある。すでに数種類の化合物が報告されており、なかでも 11-メルカプトウンデカン酸を用いて粒子表面にカルボキシル基を保持させることで親水性粒子とする方法は広く支持されている。まず 11-メルカプトウンデカン酸を 80°C に加熱し恒温に保つと溶融しており、この溶融した 11-メルカプトウンデカン酸に前述のナノ粒子を溶かしこみ数時間加熱し付加することで粒子表面の物性を親水性に転換でき、さらにナトリウム塩又はカリウム塩とすることで水溶性ナノ粒子を得られる。しかしながらこの粒子は pH の変化

や生理食塩水などの生物分野における実験条件では容易に凝集がみられる。これを回避するために市販品のナノ粒子では両親媒性ポリマーで粒子を被覆することでこの問題を回避しているが粒子が粗大となることが判明しており、本研究のようにナノ粒子内に封入する目的には適さない。そこで、両親媒性の低分子化合物であるオリゴペプチド、特にシステインを有する様々なジペプチドを用いてナノ粒子の表面に付加させる加工を行い、それら粒子の物理化学的あるいは生物適応特性をそれぞれ検討した。

2) ナノ粒子の生物的安全性の検討

ナノ粒子の安全性に関する検討は、我が研究グループにおいてこれまでに MTT 法によりミトコンドリアの呼吸能力の計測 (Shiohara A et al., Microbiol. Immunol. 2004) を、またナノ粒子による遺伝子毒性の定量的評価法としてコメット法による判定を導入し (Hoshino A et al., Nano Letters. 2004) 世界的に評価されている。これら方法を踏襲しナノ粒子の安全性評価を実施した。

C. 研究結果

1) ジペプチドを用いた水溶性表面加工

システインを有する様々なジペプチドを化学合成し、疎水性ナノ粒子の表面に付加させた。其の結果、システニルプロリン・ジペプチドが最も水溶液中で安定であった。またこのシステニルプロリン・ジペプチドのシステインのアミノ基をメチル基に置き換えた誘導体を付加させると相対蛍光強度が非常に高くなることが判明した。

2) ナノ粒子の生物的安全性の検討

ミドリザル腎上皮細胞株である Vero 細胞の培養上清に水溶性ナノ粒子を添加し、細胞の呼吸能力と遺伝子毒性を定量化した。細胞の呼吸能力測定の結果、細胞毒性については閾値が存在することを明らかにした。

これにより安全基準を設定することが可能となり、医療応用および産業化において重要な一歩をクリアしたことになった。また、これまで問題となっていたナノ粒子の光毒性は、長時間励起によるカドミウム核の崩壊が主因であり、コア・シェル型ナノ粒子による外殻形成がカドミウムイオンの溶出を阻止していることも判明した (Shiohara A, et al., J Chem. Eng. Jpn.2006)。また、上記の様々な表面加工粒子を用いた遺伝子毒性試験の結果、ナノ粒子の安全性や毒性は、その表面加工に深く依存している知見を見出した (Hoshino A et al., Nano Letters. 2004)。即ち、その化合物自体に細胞毒性があるもので表面加工した場合にはナノ粒子全体が毒性を発揮する一方、徹底した精製による不純物除去や無毒性分子による表面付加によりこれら粒子の毒性を製造段階から制御可能であるということである。これら事実により、生物・医療応用に最適な表面加工およびその製造過程を明らかにした。

D. 考察

半導体ナノ粒子を用いて生物実験を行う基礎的条件ともいえる細胞に対する安全性あるいは毒性を定量的に観測することが可能となった。同様の手段にて今後さまざまなナノ材料の解析に有効であると考えられる。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada, T., Seno, M., Kondo, A., Ueda, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S.	Pinpoint Drug Delivery System Using Hollow Bio-Nanoparticles.	高分子論文集	61(12)	606-612	2004
Yamada, T., Kondo, A., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S.	Novel Tissue and Cell Type-specific Gene Delivery System Using Surface Engineered Hepatitis B Virus Nanoprotein Particles.	Current Drug Targets: Infectious Disorders	4(2)	163-167	2004
Yu, D., Amano, C., Fukuda, T., Yamada, T., Kuroda, S., Tanizawa, K., Kondo, A., Ueda, M., Yamada, H., Tada, H., and Seno, M	The Specific Delivery of Proteins to Human Liver Cells by Engineered Bio-Nanocapsules.	FEBS J.	272(14)	3651- 3660	2005
Yu D, Fukuda T, Tuoya, Kuroda S, Tanizawa K, Kondo A, Ueda M, Yamada T, Tada H, Seno M.	Engineered bio-nanocapsules, the selective vector for drug delivery system.	IUBMB Life	58(1)	1-6	2006
Shishido T, Muraoka M, Ueda M, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S, Fukuda H, Kondo A.	Secretory production system of bionanocapsules using a stably transfected insect cell line.	Appl Microbiol Biotechnol	73(3)	505-511	2006
Iwasaki Y, Ueda M, Yamada T, Kondo A, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S, Sakamoto M, Kitajima M.	Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles	Cancer Gene Ther.	14(1)	74-81	2007
Nagaoka, T., Fukuda, T., Yoshida, S., Yu, D., Kuroda, S., Tanizawa, K., Kondo, A., Ueda, M., Yamada, H. and Seno, M.	Characterization of bio-nanocapsule as a transfer vector targeting human hepatocyte carcinoma by disulfide linkage modification.	Journal of Controlled release	118	348-356	2007
近藤昭彦, 黒田俊一, 谷澤克行, 妹尾昌治, 上田政和	中空バイオナノ粒子を用いた DDS の開発とその産業化	Drug Delivery system	4	435-443	2006

〔総合論文〕

中空バイオナノ粒子を用いたピンポイントドラッグデリバリーシステム

山田 忠範^{*1}・妹尾 昌治^{*2,*5}・近藤 昭彦^{*3,*5}
上田 政和^{*4,*5}・谷澤 克行^{*1}・黒田 俊一^{*1}

(受付 2004 年 6 月 7 日・審査終了 2004 年 7 月 2 日)

要旨 B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus; HBV)はヒト肝細胞に対し強い感染力を有する。その感染機構を担うHBV表面抗原(HBV surface antigen; HBsAg)は、組換え酵母を用いて大量生産が可能であり、酵母由来の膜成分を取り込んで、平均直径220 nmのHBsAg粒子を形成することが知られている。最近、HBsAg粒子内部に遺伝子、タンパク質および薬剤を封入して、静脈注射のみでヒト肝臓特異的送達が可能なるキャリアーとして非常に有効であることを示した。また、HBsAg粒子の表面に存在するヒト肝細胞特異的な認識部位を、他の細胞を認識する分子へ置換することにより、粒子表面の提示分子に応じた標的細胞を生体内で標的化する「中空バイオナノ粒子」の創製に成功した。これらの結果は、生体内ピンポイントデリバリーシステムの新しいキャリアーとして、特に遺伝子治療分野で中空バイオナノ粒子が非常に有望であることを示している。

1 緒 言

遺伝子治療とは、病気の原因へ遺伝子レベルで働きかけることで症状の改善や病気の治癒を目指す治療法であり、遺伝病、癌やエイズなどの難治性疾患に対する革新的治療法として注目を集めている。1990年に臨床研究が開始されて以来、アメリカを中心に4000人以上の患者が治療を受けている。遺伝子治療では、治療に適するように設計された遺伝子を治療対象の細胞内へ効率よく導入し、その遺伝子発現を治療レベルまで高めて維持させることが必要となる。そのため、今後、遺伝子治療が成功を収めるためには標的細胞へ治療用遺伝子を的確に効率よく送達する遺伝子導入技術が不可欠であり、遺伝子の運び屋である“ベクター”と呼ばれるツールが最も重要な鍵を握っている。

通常、細胞は自身を取り巻く生体膜によって外界から遮断されており、ほとんどの分子を通過させない。したがって、遺伝子のように分子量が100万を超えるような巨大高分子は単独では細胞内へ侵入することは難しい。

また、遺伝子は生体内では非常に不安定であり、速やかに分解される。このような遺伝子を細胞内へ送達するために、遺伝子工学の進展に併せて、さまざまなベクターが開発されており、すでにいくつかは国内外で臨床試験が進められている。しかしながら、利用が広まるに従い解決すべき問題が数多く判明してきた。特に、ここ数年間にアメリカ・フランスでの臨床試験中における事故が報告されるなど、ベクターに起因する副作用が発生しており、ベクターの安全性に対して大きな懸念が広がっている^{1),2)}。1999年アメリカで行われたアデノウイルスベクターを使った遺伝子治療では、大量にベクターを投与された19歳の男性が投与後にショック死する事故が起きた。これは遺伝子治療における初めての死亡例となった。また、1999年にフランスで開始された重症複合型免疫不全症(severe combined immunodeficiency-X1, 以下SCID-X1)に対する遺伝子治療では、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行ったものであり、長期の症状改善がみられていたが、2002年にベクターを投与された二人の患者に白血病が発症した。これは、ベクター由来の遺伝子が患者の染色体ゲノム中の癌抑制遺伝子近傍に挿入されたことが引き金になったと考えられている。

したがって、さらに高い安全性と効率のよい遺伝子送達を実現するベクターの登場が望まれており、医学・薬学・工学の各方面よりベクター開発が進められている。

^{*1} 大阪大学産業科学研究所(☎567-0047 茨木市美穂ヶ丘8-1)

^{*2} 岡山大学大学院自然科学研究科(☎700-8530 岡山市津島中3-1-1)

^{*3} 神戸大学工学部応用化学科(☎657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1)

^{*4} 慶應義塾大学医学部外科学教室(☎160-8582 東京都新宿区信濃町35)

^{*5} (株)ビーグル(☎701-1221 岡山市芳賀5303)

Table 1. Comparison of various vector systems

Features	Retrovirus	Adenovirus	AAV	Naked/ Lipid-DNA
Transfection efficiency	Good	Good	Poor	Poor
Pathogenicity	Yes	Yes	No	None
Immunological problems	Few	Extensive	Not known	None
Maximum insert DNA size	7-7.5 kb	~30 kb	3.5-4 kb	Unlimited
Cell/tissue specificity	No	No	No	No

2 遺伝子導入ベクターの現状

遺伝子治療で利用される生体内遺伝子導入法には大別して、感染性ウイルスを基としたウイルスベクター法とウイルスを用いない非ウイルス型導入法がある。遺伝子治療の臨床試験には主に Table 1 に示すような遺伝子導入ベクターが利用されている。

2.1 ウイルスベクター法

元来、ウイルスは自分自身の遺伝子を宿主となる細胞へ積極的に導入し、これを細胞内で増幅させることで自らを増殖させる機構をもっている。この機構を外来遺伝子の導入に利用したものがウイルスベクターである。

最もよく利用されているベクターはレトロウイルスベクターで、外来遺伝子を導入細胞の染色体ゲノムへ効率よく組み込むことができ、長期間にわたる遺伝子発現が期待できる。しかし、非分裂細胞への遺伝子導入がほとんど起こらないため、生体内(以下 *in vivo*)投与による遺伝子導入は困難である。そのため、標的細胞を一旦身体より取出し、遺伝子導入して一定数まで増殖させた後、体内へ戻す体外(以下 *ex vivo*)投与方法に主に利用されている。この問題を解決するために、ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus type 1, 以下 HIV-1)を基としたレンチウイルスベクターの開発が進められている³⁾。レンチウイルスベクターはレトロウイルスベクターの特長をもちながら、非分裂細胞への外来遺伝子の導入が可能である。しかし、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターによる外来遺伝子の染色体ゲノムへの組み込み部位はランダムであることから、患者の遺伝子情報を攪乱させることで正常遺伝子の機能を低下させたり、癌遺伝子を活性化させたりする危険性が常に存在する。

レトロウイルスベクターと並んでよく利用されるアデノウイルスベクターは、分裂細胞・非分裂細胞の区別なく広範囲のさまざまな細胞に効率よく外来遺伝子を導入することが可能である。しかし、*in vivo*投与を行うと体内のあらゆる組織へ遺伝子を導入してしまい、不適切な部位での遺伝子発現は予想不能な副作用を生じさせる

危険性がある。また、レトロウイルスベクターとは異なり導入された外来遺伝子の発現は一過性である。そのため、長期間の遺伝子発現を実現するには繰返し投与することが必要であるが、ベクター自身に強い細胞毒性や抗原性があり、繰返し投与を行うことは難しい。

近年、これらに代わるウイルスベクターとしてアデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus, 以下 AAV)ベクターの研究が進められている。AAVベクターは非分裂細胞にも外来遺伝子を導入でき、ヒト第 19 番染色体の特定の位置への組み込みが可能である。また、ヒトへの病原性がないので安全性は高いと考えられている。しかし、標的細胞への遺伝子導入効率が非常に低いこと、ベクターの大量生産の技術が確立していないこと、ベクターの導入できる外来遺伝子の大きさが非常に小さく限定されることなどの欠点がある。

わが国独自のベクターとして、センダイウイルス(Sendai virus, 以下 SeV)ベクターの研究が進められている⁴⁾。1997年に開発された SeVベクターは、SeVの膜融合能力により広範囲の細胞・組織へ高い効率で外来遺伝子を導入することが可能である。しかしながら、標的細胞への遺伝子導入後に SeVベクターが増殖複製して、二次伝播が生じることがあり、臨床応用には早期の解決が必要である。また、*in vivo*では赤血球にトラップされるので現時点での臨床応用は困難と考えられる。

2.2 非ウイルス型導入法

非ウイルス型導入法では、治療用遺伝子のみをコードするプラスミドを利用するため、ウイルスベクター法のようにウイルス由来遺伝子が混入することがなく、患者遺伝子に対する影響は遥かに少ないと考えられる。その中でも、最も代表的な導入法はリボソームである。リボソームは古くから薬物送達システム(drug delivery system, 以下 DDS)のためのキャリアーとして利用されてきており、遺伝子のような巨大高分子の送達も可能である。すでに人体への安全性が高く、内部に封入できる遺伝子の大きさに制限がないこと、キャリアーの作製が容易であることなど、ウイルスベクター法と異なる特長をもつことが知られている。しかし、積極的に細胞内へ感染侵入する機構がないために遺伝子導入効率が極めて低く、また特定の標的細胞への遺伝子導入は困難である。近年、リボソームを構成する脂質を工夫することで、細胞への遺伝子導入効率を向上させようとする試みがなされているが、ウイルスベクターに匹敵する効率は得られていない。

最近、プラスミド DNA を標的組織内へ局所注入する手法が行われている⁵⁾。プラスミド DNA の局所注入は非常に簡便な投与方法であり、投与可能な遺伝子の大きさに制限がない。一方、投与した遺伝子は注入した部位近傍にしか導入されずに組織全体へ拡散していかないこと

から、多くの個所へ注入しなければ治療効果が現れにくいという欠点がある。

2.3 ハイブリッドベクター

近年、従来の欠点を克服するために、ウイルスベクターと非ウイルスベクターの特長を併せもつハイブリッドベクターが登場した。代表的なものとしては、SeV とリポソームを組合せた膜融合型リポソーム (fusogenic liposome, 以下 FL) ベクターがある⁶⁾。具体的には、紫外線で不活化させた SeV と治療用遺伝子をあらかじめ包含させたりポソームを融合して作製する。FL ベクターは SeV の膜融合能力を保持したまま、広い範囲の細胞種へ遺伝子以外の物質も導入できることが示されている。また、FL ベクターは SeV ベクターと異なり、二次伝播が生じない利点がある。しかしながら、その高い膜融合能力のために、SeV ベクターと同様に生体内では主に赤血球にトラップされるので、経口あるいは血流を通じた標的組織への遺伝子や薬剤の特異的導入は困難である。

以上のように、現在汎用されている生体内遺伝子導入法には、それぞれに長所と短所があり、まだ決定的なベクターは現れていない。遺伝子治療を真の成功に導くためには遺伝子を効率よく、生体内で標的細胞特異的に導入できる (生体内ピンポイントデリバリー可能な) 新たなベクターが必要であり、その登場が待たれている。

3 バイオナノ粒子

私達のグループでも従来ベクターの欠点を克服するための新規遺伝子治療用ベクターの開発を進めてきた。この新規ベクターは B 型肝炎ウイルス表面抗原 (hepatitis B virus surface antigen, 以下 HBsAg) 粒子を基としており、酵母を用いて生産されるナノサイズの中空粒子であることから“中空バイオナノ粒子”と呼んでいる。この中空バイオナノ粒子は、今までとは大きく異なるベクターであり、想定される短所をほぼ完全に克服しており、遺伝子治療のみならず種々のアプリケーションに応用できると期待される。

3.1 中空バイオナノ粒子の性質

中空バイオナノ粒子の骨格となる HBsAg 粒子は、B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, 以下 HBV) の外殻に相当するもので、外被タンパク質 (HBsAg 分子) と宿主由来の脂質二重膜から成る中空状粒子である^{7),8)}。HBsAg 粒子は、HBV のようにウイルス本体の遺伝子や遺伝子を複製するのに必要となる酵素などを含む核となるタンパク質群を一切もたない (Figure 1)。ウイルスには外殻をもつタイプは他にも知られているが、HBsAg 粒子のように外被タンパク質が単独で脂質二重膜を含む形で中空状粒子を形成するものは他にない。HBsAg 分子は HBV ゲノム上にコードされ、翻訳開始位置の違

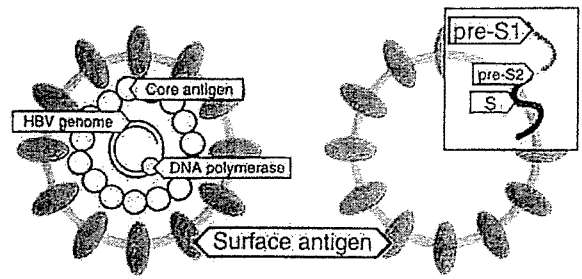


Figure 1. HBV and HBsAg particle. HBV (left) consists of DNA genome, polymerase, core antigens, surface antigens (HBsAg), and lipid bilayer. HBsAg particle (right) consisting of surface antigens and lipid bilayer is a hollow nanoparticle. The HBsAg particle retains the high infectivity to human liver cells without replication activity. The HBsAg L protein contains pre-S1, pre-S2 and S regions (inset). The S region is a transmembrane protein indispensable for the particle formation. The pre-S1 region on the surface is responsible for the specific infection to human liver cells.

いによって3種類のタンパク質に分かれ、それぞれ S (small), M (middle), L (large) と呼ばれる。S タンパク質は 226 アミノ酸から成り、M タンパク質は S タンパク質の N 末端側に 55 アミノ酸から成る pre-S2 領域が付加された形になっている。L タンパク質は M タンパク質の N 末端側に 108 または 119 アミノ酸から成る pre-S1 領域が付加している。この pre-S1 領域は肝細胞と直接結合する部位 (約 70 アミノ酸) を含んでおり、ヒト肝細胞へ特異的に感染する際に中心的な役割を担っている。また、pre-S1 領域の作用により、HBV のトロピズムはチンパンジーとヒトの肝臓に厳格に限定されている^{9)~12)}。

HBsAg 粒子は HBV の抗原として免疫原性をもち、HBV に対する抗体を誘導することから、HBV に対するワクチン用抗原として有効であることが早期から知られている。B 型肝炎感染者は世界的に多いので、1980 年代後半から遺伝子組換え技術による各種細胞を用いた大量生産法の開発が精力的に行われてきた。しかし、通常細胞内では pre-S1 領域が L タンパク質の生合成を阻害する作用を示すため、その多くが S タンパク質あるいは M タンパク質から成る S 粒子、M 粒子であった。1992 年、筆者らは pre-S1 領域の N 末端側にシグナル・ペプチドを付加することにより、L 粒子を効率よく生産することに世界で初めて成功した¹³⁾。このとき発現する L タンパク質は酵母の全可溶性タンパク質の 42% にまで達した。現時点において、これは組換え酵母を用いたタンパク質生産の中で最も生産量の高い例である。また、この L 粒子は S 粒子あるいは M 粒子に比べ、HBV に対する抗体の誘導能が優れていることもわかった。L 粒子の物理的性質を調べたところ、HBV と同様に

熱に対して非常に安定であった。また、原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy, 以下 AFM) による観察から、その平均直径は 220 nm であることが判明した (Figure 2)¹⁴⁾。

3.2 遺伝子治療用ベクターとしての中空バイオナノ粒子

中空バイオナノ粒子による遺伝子導入を検証するために、モデル遺伝子として、オワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (green fluorescence protein, 以下 GFP) の発現遺伝子を用いた。L 粒子内部に遺伝子を封入するために種々の手法を検討した結果、電気穿孔法を用いることで簡便に遺伝子を封入できることがわかった。GFP 発現

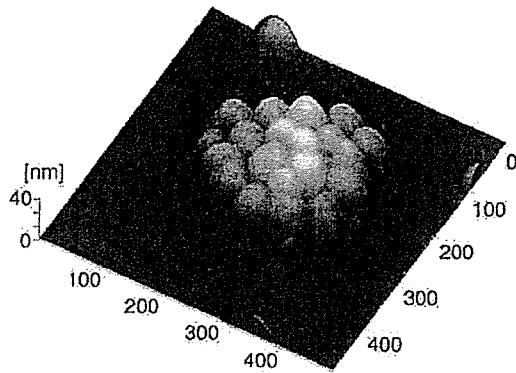


Figure 2. Shape of HBsAg L particles by AFM observation. Five microliters of a solution of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of HBsAg L particles extensively dialyzed against distilled water were spotted onto mica and observed by AFM. The scan area is 500 \times 500 nm.

遺伝子を封入した L 粒子を培養ヒト肝細胞株および数種のヒト肝癌由来細胞株の培養上澄みに血清存在下で添加すると、いずれの細胞においても GFP に由来する蛍光を観察することができた (Figure 3A)。また、研究用遺伝子導入試薬 (リボソームの一種) を用いた場合より遺伝子の使用量が 1% 未満で十分であった。一方、対照として数種の非肝臓系の細胞株にも同様に GFP 発現遺伝子の導入を試みたが、GFP に由来する蛍光は観察されなかった。

中空バイオナノ粒子による生体内遺伝子導入を検討するために、ヒト肝癌由来細胞株とヒト大腸癌由来細胞株を固形癌として同じマウスの背部へ移植した担癌マウスを作製した。同様の手順で粒子内部に GFP 発現遺伝子を封入した L 粒子を用いて、マウス尾静脈より血流へ投与した。GFP 発現遺伝子含有 L 粒子は、移植したヒト肝癌由来固形癌のみに到達し、その結果、組織内にて GFP の発現を観察することができた。また、対照組織ならびにマウス各臓器においては GFP に由来する蛍光は観察されなかった。以上のことより、培養細胞・生体内にかかわらず中空バイオナノ粒子 (L 粒子) は内包する遺伝子をヒト肝細胞・組織特異的に送達することが可能であることが示された¹⁵⁾。

続いて、遺伝子治療で用いられる治療用遺伝子を用いた遺伝子治療モデルの検証実験を行った。ここでは対象疾患として血友病 B を、治療用遺伝子には血友病 B の遺伝子治療で利用されている血液凝固第 9 因子 (blood clotting factor IX, 以下 FIX) 発現遺伝子を用いた。FIX 発現遺伝子の封入には、GFP 発現遺伝子の場合と同様

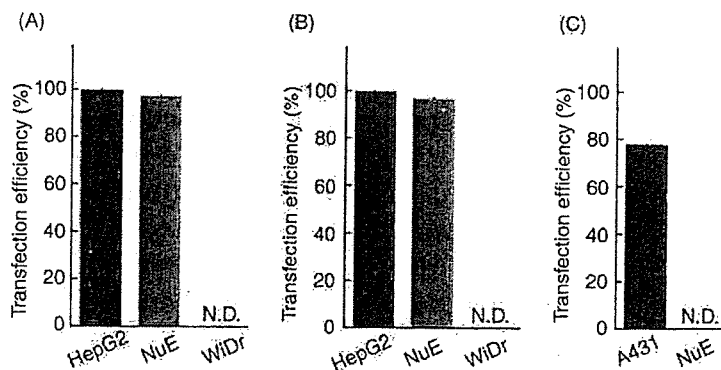


Figure 3. (A) *Ex vivo* gene transfer with L particle. The L particles containing GFP expression plasmid were transfected to two human hepatocellular carcinoma cell lines (HepG2, NuE) and human colon adenocarcinoma cell line (WiDr). Transfection efficiency was calculated with the ratio of GFP-expressing cells to all cells. (B) *Ex vivo* drug delivery with L particles. The L particles containing fluorescent dye, calcein were transfected to HepG2, NuE (both human hepatocellular carcinoma) and WiDr (human colon adenocarcinoma) cells. (C) The EGF-displayed particles containing calcein were transfected to NuE and A431 (squamous cell carcinoma) cells. Transfection efficiency was calculated with the ratio of calcein-containing cells to all cells.

に、電気穿孔法にて行った。FIX 発現遺伝子含有 L 粒子を担癌マウスの尾静脈より投与した後に経時的に採血を行い、ELISA 法にて血中 FIX 量を求めた。その結果、投与後 4 日目にマウス血中に FIX が発現し、3 週間にわたり血友病 B の重症患者に対する治療効果が期待できる発現レベルを維持した¹⁵⁾。このように 1 回の静脈注射で 1 ヶ月近い治療効果が現れる血友病治療薬剤は他には存在しない。

3.3 DDS キャリヤーとしての中空バイオナノ粒子

中空バイオナノ粒子は、薬剤などの生理活性物質も内部に包含し、標的細胞へ送達させることが期待できる。私達は、モデル化合物として蛍光物質カルセインを用いて薬剤送達の検証を試みた。GFP 発現遺伝子の場合と同様に、電気穿孔法を用いることで簡便にカルセインを L 粒子内部に封入できることが判明した。カルセインを封入した L 粒子をヒト肝癌由来細胞株の培養上澄みに添加すると、カルセインに由来する蛍光を観察することができたが、対照として数種の非肝細胞系の細胞株では観察されなかった (Figure 3B)。

また、ヒト肝癌由来固形癌とヒト大腸癌由来固形癌を移植した担癌マウスの尾静脈よりカルセイン含有 L 粒子を血流へ投与した結果、移植したヒト肝癌由来固形癌の組織内にてカルセインに由来する蛍光を観察することができた。また、対照組織ならびにマウス各臓器においては蛍光を観察することができなかつた。以上のことより、低分子化合物の場合でも培養細胞・生体内かかわらず中空バイオナノ粒子はヒト肝細胞・組織特異的に送達することが可能であることが示された¹⁵⁾。

3.4 中空バイオナノ粒子の再標的化

中空バイオナノ粒子の骨格となっている L 粒子表面には肝細胞結合部位 (約 70 アミノ酸) が提示されている。この部位が中空バイオナノ粒子に肝細胞への特異性を付与していることから、任意の生体認識分子に置換することで肝細胞以外の細胞へ標的化することが期待される。

モデル生体認識分子として上皮成長因子 (epidermal growth factor, 以下 EGF) を選択し、上記肝細胞結合部位とカセット式に置換した EGF 提示型 L 粒子を創製した。EGF 提示型 L 粒子の生産は、L 粒子と同様に組換え酵母を用いた生産系にて行うことが可能である。生産した EGF 提示型 L 粒子を用いてカルセインの薬剤送達を行ったところ、EGF と結合する EGF 受容体を細胞表面に発現している細胞のみカルセインを導入することができた (Figure 3C)¹⁵⁾。

以上のことより、中空バイオナノ粒子には遺伝子治療用ベクターならびに DDS に適した以下のような特長もっている (Figure 4)。

(1) 中空バイオナノ粒子は、その表面に肝細胞結合

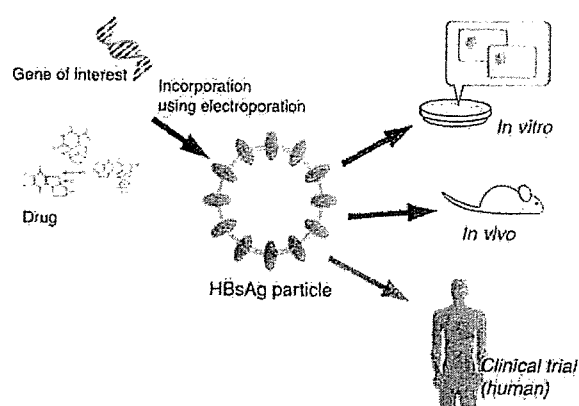


Figure 4. Concept of Hollow bio-nanoparticle technology. HBsAg particles can deliver drugs (chemicals and proteins) and genes to human liver-derived tissues and cells in cultured cells, xenograft models, and humans.

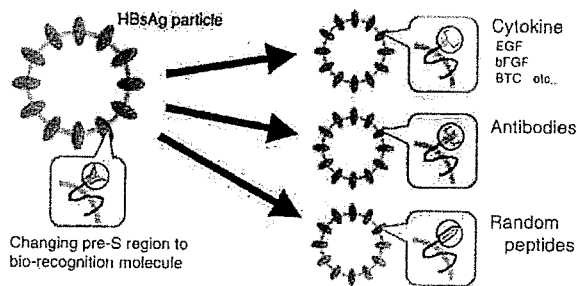


Figure 5. Strategy for changing the cell specificity of HBsAg particles from hepatophilicity to others. The pre-S region displayed on the nanoparticles can be changed by the substitution with cytokines, antibodies, and random peptides.

部位を提示しており、HBV と同様にヒト肝細胞への高い親和性と高い導入効率 (感染能力) を有する。

(2) 内部が中空状であるため、遺伝子・薬剤などの生理活性物質を封入することが可能。

(3) 副作用の原因となるウイルス由来の遺伝子を一切含まないため、病原性はない。

(4) 組換え酵母にて大量生産することが可能。

(5) 粒子表面に提示されている肝細胞結合部位を、他の生体認識分子へ置換することで、分子に応じた標的細胞へピンポイントで送達可能 (Figure 5)。

4 中空バイオナノ粒子の展望

中空バイオナノ粒子は、内部に封入した物質を提示する生体認識分子に応じた細胞に、生体内でピンポイントで送達することができる。それゆえ、遺伝子治療用ベクターだけでなく、DDS のキャリアーとしても有望である。本粒子を用いたアプリケーションはさまざまなものが考えられるが、ここではそれらの一例を示したい。

4.1 肝疾患に対する治療

バイオナノ粒子は元来、肝臓指向性が高いため、肝臓を標的細胞とする治療に適している。

現在、肝臓癌に特異的に遺伝子を発現させる場合、遺伝子の発現をコントロールするためのプロモーターと呼ばれる配列を利用する。肝細胞が癌化すると多くの場合アルファフェトプロテイン(α -feto protein, 以下 AFP)が産生することが知られており、AFP 発現時に作用する AFP プロモーターを用いると癌化した肝細胞にのみ特異的な遺伝子の発現が実現される¹⁶⁾。しかし、肝臓癌の中には AFP の産生を伴わないものもあり、そのような種類の癌に適用できなかった。しかし、中空バイオナノ粒子を用いることで AFP の産生の有無にかかわらず、肝臓癌にて治療用遺伝子の発現を行うことが可能となる。加えて、癌細胞は正常細胞とは異なるタンパク質をその細胞表面に提示することが知られているため、このタンパク質に対する認識分子を提示することで、より確実な標的化を行うことが可能となる。

近年、ウイルス性肝炎に対して、インターフェロン(interferon, 以下 IFN)を用いた治療が行われるようになった。しかしながら、IFN を全身投与するとさまざまな副作用が生じることが多く、その効果が十分に発揮されることが少ない。そこで、バイオナノ粒子を用いて肝臓にのみ送達できれば、これらの副作用を大きく低減させることが期待できる。

4.2 抗癌剤による癌治療

癌治療の多くはそれぞれの癌に対して有効な抗癌剤を全身投与することが行われている。抗癌剤は細胞を殺傷する能力に優れているが、癌細胞と正常細胞の区別ができないため、副作用が避けられない。したがって、副作用を低減させるために、患部に限って送達することが肝要である。現在、癌組織の細胞間隙が大きいことに注目して、大きさに基づく DDS キャリヤーなどが開発されているが、これらは受動的送達であり、患部への積極的な薬剤送達の実現には至っていない。バイオナノ粒子を用いた薬物送達では、提示した生体認識分子に応じた標的細胞に内包させた薬剤を送達することが可能であり、DDS 技術が目的とする「必要な量」の薬剤を「必要な部位」に送達することを達成できるものと期待される。

5 結 語

遺伝子治療や癌治療などに使用される遺伝子や薬剤は、一般に生体内では不安定で作用部位に対する特異性もない。治療効率の向上のためには、静脈注射にも対応できるピンポイント DDS 技術が不可欠である。しかしながら、現状では目的にかなった DDS 技術はなく、新しい技術の登場が望まれている。中空バイオナノ粒子は現状の DDS 技術が解決すべき課題点を大きく改善する可能性を秘めている技術であり、生物医学研究、先進医療を前進させることが可能であると考えられる。

文 献

- 1) E. Marshall, *Science*, **298**, 34 (2002).
- 2) J. Savulescu, *J. Med. Eth.*, **27**, 148 (2001).
- 3) S. Brenner and H. L. Malech, *Biochim. Biophys. Acta*, **1640**, 1 (2003).
- 4) M. K. Hasan, A. Kato, T. Shioda, Y. Sakai, D. Yu, and Y. Nagai, *J. Gen. Virol.*, **78**, 2813 (1997).
- 5) J. A. Wolff, R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, and P. L. Felgner, *Science*, **247**, 1465 (1990).
- 6) I. Yanagihara, K. Inui, G. Dickson, G. Turner, T. Piper, Y. Kaneda, and S. Okada, *Gene Ther.*, **3**, 549 (1996).
- 7) P. Tiollais, C. Pourcel, and A. Dejean, *Nature*, **317**, 489 (1985).
- 8) A. R. Neurath and S. B. Kent, *Adv. Virus Res.*, **34**, 65 (1988).
- 9) K. H. Heermann, U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten, and W. H. Gerlich, *J. Virol.*, **52**, 396 (1984).
- 10) A. R. Neurath, S. B. Kent, N. Strick, and K. Parker, *Cell*, **46**, 429 (1986).
- 11) P. Pontisso, M. G. Puvolotto, W. H. Gerlich, K. H. Heermann, R. Bardini, and A. Alberti, *Virology*, **173**, 522 (1989).
- 12) S. De Meyer, Z. J. Gong, W. Suwandhi, J. van Pelt, A. Soumillion, and S. H. Yap, *J. Viral. Hepat.*, **4**, 145 (1997).
- 13) S. Kuroda, S. Otaka, T. Miyazaki, M. Nakao, and Y. Fujisawa, *J. Biol. Chem.*, **267**, 1953 (1992).
- 14) T. Yamada, H. Iwabuki, T. Kanno, H. Tanaka, T. Kawai, H. Fukuda, A. Kondo, M. Seno, K. Tanizawa, and S. Kuroda, *Vaccine*, **19**, 3154 (2001).
- 15) T. Yamada, Y. Iwasaki, H. Tada, H. Iwabuki, M. K. Chuah, T. VandenDriessche, H. Fukuda, A. Kondo, M. Ueda, M. Seno, K. Tanizawa, and S. Kuroda, *Nat. Biotechnol.*, **21**, 885 (2003).
- 16) H. Su, R. Lu, J. C. Cheng, and Y. W. Kan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 13891 (1997).

[Comprehensive Papers]

Pinpoint Drug Delivery System Using Hollow Bio-Nanoparticles

Tadanori YAMADA,*¹ Masaharu SENO,*^{2,*5} Akihiko KONDO,*^{3,*5} Masakazu UEDA,*^{4,*5} Katsuyuki TANIZAWA,*¹ and Shun'ichi KURODA*¹

*¹*Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University (8-1 Mihogaoka, Ibaraki 567-0047, Japan)*

*²*Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University (3-1-1 Tsushimanaka, Okayama 700-8530, Japan)*

*³*Graduate School of Science and Technology, Kobe University (1-1 Rokkodai, Nada, Kobe 657-8501, Japan)*

*⁴*Keio University, School of Medicine (35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan)*

*⁵*Beacle Incorporation (5303 Haga, Okayama 701-1221, Japan)*

Hepatitis B virus envelope L proteins produced in yeast cells form hollow nanoparticles (L particles, average diameter 220 nm) displaying human liver-specific receptor. Recently, the L particles were found to incorporate genes, proteins, and drugs, and act as an efficient pinpoint delivery system to human liver-derived tissues in xenograft models. By substituting the epidermal growth factor (EGF) for human liver-specific receptor, the mutated L particles showed the affinity to the EGF receptor, not to human liver. Other similar HBV envelope proteins, *e.g.*, M and S particles, have already been commercialized for hepatitis B vaccine, strongly suggesting the safety of L particles in human. These results indicate that the hollow bio-nanoparticles are a promising candidate for the next-generation platform of DDS, especially that related to gene therapy.

KEY WORDS Hepatitis B Virus / Drug Delivery System / Gene Therapy / Yeast / *in vivo* / Nanoparticle / Hemophilia / Retargeting /

(Received June 7, 2004; Accepted July 2, 2004)

[*Kobunshi Ronbunshu*, 61(12), 606–612 (2004)]

Novel Tissue and Cell Type-specific Gene/Drug Delivery System Using Surface Engineered Hepatitis B Virus Nano-particles

Tadanori Yamada¹, Maşakazu Ueda^{2,5}, Masaharu Seno^{3,5}, Akihiko Kondo^{4,5}, Katsuyuki Tanizawa¹ and Shun'ichi Kuroda^{1,*}

¹Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan, ²Keio University, School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan, ³Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, 3-1-1 Tsushimanaka, Okayama 700-8530, Japan, ⁴Faculty of Engineering, Kobe University, 1-1 Rokkodai, Nada, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan, ⁵Beacle Inc., 314 Okayama Research Incubation Center, 5303 Haga, Okayama 701-1221, Japan

Abstract: The hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) L particle is a hollow nano-scale particle. HBsAg L particles have many properties that make them useful for *in vivo* gene transfer vectors and drug delivery systems. Gene therapy so far has required the *in vivo* pinpoint delivery of genetic materials into the target organs and cells. Gene transfer by HBsAg L particles might be an attractive method, since their tropism is the same as that of HBV. The HBsAg L particles are able to deliver therapeutic payloads with high specificity to human hepatocytes. In addition, the specificity of L particle can be altered by displaying various cell-binding molecules on the surface. Our results indicate that the L particle is suitable for a cell- and tissue-specific gene/drug transfer vector. In this review, we discuss HBsAg L particles as a gene/drug transfer vector and its potential for the treatment of infectious diseases.

Key Word: HBsAg L particle, gene delivery, drug system, *in vivo* system.

INTRODUCTION

Gene therapy is recognized as a promising approach for treating serious diseases, including monogenic diseases, infectious diseases and cancer [1, 2]. Gene therapy is based upon the introduction of therapeutic genes into the target cells and organs of patients. In the previous decade, gene therapy was initially adapted to the treatment of genetic diseases, such as adenosine deaminase severe combined immunodeficiency (ADA-SCID). At present, the clinical trials on primary immunodeficiency diseases (PID) are being continued by several groups [3-5]. Recent advances in virology, biochemistry, and molecular biology allow us to approach infectious diseases at the molecular level and supply us with useful genetic information for designing therapeutic reagents. Therefore, gene therapy may prove suitable for a number of infectious diseases. Currently, the strategies against viral infections include genetic vaccination stimulating the host immune responses and the inhibition of viral replication with gene products, such as antisense DNA/RNA, RNA interference (RNAi), and DNA decoys. However, the lack of appropriate and safe gene transfer vectors has severely restricted gene therapy in the mortal diseases.

Various methods have been developed for delivering therapeutic genes to the target cells or organs. Recombinant viral vectors, like retroviruses [6] and adenoviruses [7], represent one such approach. The greatest advantage of viral vectors is their high efficiency of gene transfer. However,

there are severe limitations due to the properties of wild-type viruses. The viral vectors transfer genes into cells other than the target cells because of their wide range of cell infectivity. Thus, these vectors are rarely used to *in vivo* methods and applications. Retroviral vectors, which are popular vectors in clinical trials, have the ability to integrate their genomes into the host chromosomal DNA [8-10]. This results in a long-term expression of transgenes, while it is difficult to control the insertion position in the chromosome of the infected cells, and random site integration may lead to gene inactivation or activation of oncogenes [11, 12]. In 2002, two children were found to develop leukemia during the gene therapy trials in France [13, 14]. They were treated for X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using a retroviral vector [4]. In this case, the retroviral vector has integrated its payload in proximity to T-cell oncogene *LMO2*, and led to premalignant cell proliferation with unexpected frequency.

In order to succeed in gene therapy, the gene delivery system should possess the following features; (i) effectiveness of delivering genetic materials, (ii) preciseness of delivering into the appropriate target cells and organs, (iii) preciseness of delivering into the appropriate genetic site, and (iv) overall safety for patients. Although there have been many attempts to develop a novel gene transfer system, no system has so far fulfilled these important criteria. This current situation prompted us to develop a novel gene transfer vector based on hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) L particle. Our previous report demonstrated the properties of HBsAg L particle are suitable for a novel vector system. In this review, we discuss HBsAg L particle as a gene transfer vector and also their potentials in treating infectious diseases.

*Address correspondence to this author at the Department of Structural and Molecular Biology, Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka, 567-0047, Japan; Tel: +81-6-6879-8462; Fax: +81-6-6879-8462; E-mail: skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp

WHAT IS HBsAg L PARTICLE?

HBV is a human liver-specific DNA virus, whose 3.2-kbp genome harbors three overlapping envelope (*env*) genes in a single open reading frame. Depending on the three translation initiation codons, three related transmembrane proteins are produced in human hepatocytes, designated as small (S), middle (M), and large (L). The S protein is a major *env* protein (226 amino acid residues), and the M protein comprises the entire sequence of the S protein with an additional 55 amino acids at the amino-terminal (pre-S2 peptide). The L protein has the entire sequence of the M protein with an additional 108 or 119 amino acids (depending on the HBV subtype) at the amino-terminal (pre-S1 peptide) [15]. As shown in Fig. (1), HBsAg L particle is a hollow subviral particle consisting of HBsAg L proteins and a lipid bilayer derived from the host cell [16, 17]. The pre-S1 peptide mediates the specific attachment of HBV to human and chimpanzee hepatocytes [18-20].

Previously, we demonstrated the efficient production of HBV L particles in recombinant yeast cells (up to 42% of the total soluble proteins) [21]. Owing to the high productivity, L particles were promptly purified using only ultracentrifugal procedures, which was enough to analyze their physico-chemical properties [22]. By equilibrium sedimentation, the average molecular weight of L particles was estimated to be approximately 6.4×10^6 . Atomic force microscopy observation in a moist atmosphere had revealed L particles are large spherical particles with a diameter of 50-500 nm (average diameter is 200 nm).

HBsAg L PARTICLE AS A GENE/DRUG TRANSFER VECTOR

The HBsAg L particle is displaying a peptide that is indispensable for liver-specific infection by HBV in humans

and chimpanzees. Thus, it has been expected that L particles could serve as a vector possessing high infectivity and high specificity to human and chimpanzee hepatocytes. Recently, we demonstrated that L particles could introduce genes and drugs into human hepatocytes both in cultured cells and in laboratory animals [23]. We have found that electroporation is efficient for incorporating transgenes and drugs inside the particle. The L particles containing these materials could introduce into human hepatocytes and hepatocellular carcinoma cells, but not into control non-human hepatic cells. Also, the L particles were able to deliver their payloads through the blood stream only in human hepatocellular carcinomas, but neither in other human carcinomas nor in normal mouse tissues. Intravenous injection of the L particles containing the gene for human clotting factor IX (hFIX) resulted in the production of hFIX protein in the xenograft model at levels sufficient to the treatment of moderate hemophilia B. These data indicated that L particle is an ideal vector for the specific delivery of genes and drugs *in vitro* and *in vivo*. In addition, the L particle can be overproduced easily in yeast cells without any contamination of viral genomes. These properties demonstrate that L particle is suitable for clinical trials.

In previous studies on HBV, a sequence in the pre-S1 peptide was identified responsible for specific attachment to human hepatocytes [18, 24]. We attempted to alter the specificity of the L particle by substituting a bio-recognition molecule for the human hepatocytes-binding domain. For example, the engineered particles displaying human epidermal growth factor (EGF) lost the ability for binding to human hepatocytes and gained the affinity to the EGF receptor-expressing cells. Taken together, the HBsAg L particle-based delivery system might become a novel platform for gene transfer and drug delivery systems and could possess the tailor-made tissue/cell type specificity.

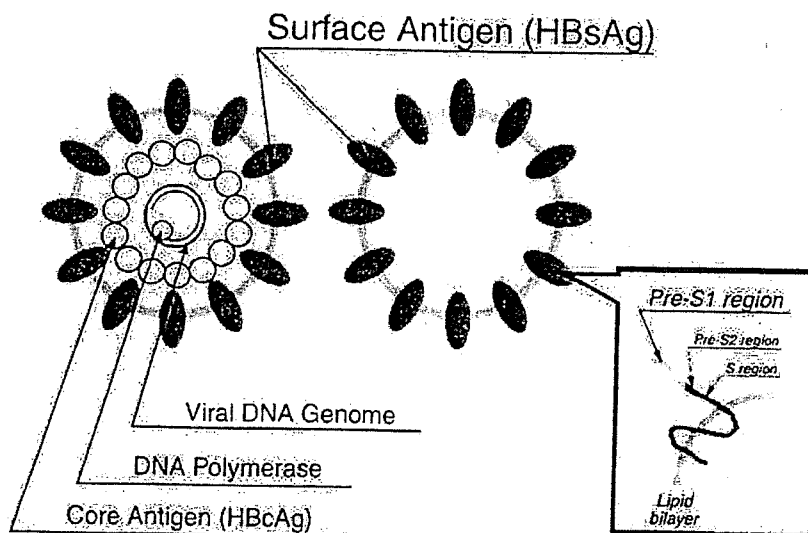


Fig. (1). Diagram of HBV and HBsAg L particle. HBV (left) contains one viral genome, one DNA polymerase, core antigens (HBcAg), surface antigens (HBsAg), and lipid bilayer. HBsAg particle (right) consisting of surface antigens and lipid bilayer is a hollow particle. The HBsAg L particle consisting of L proteins and lipid bilayer possesses the high infectivity to human liver cells without replication activity. The L protein contains pre-S1, pre-S2 and S regions (inset). The S region is a transmembrane protein indispensable for the formation of the particle. The pre-S1 region on the surface of L particle is responsible for the specific infection to human liver cells.

HBsAg L PARTICLES AS A MULTIVALENT VACCINE PLATFORM

From 1985 to 1995, the importance of the entire L protein (pre-S1 + pre-S2 + S) for the prevention of HBV infection has been recognized [18, 25-29]. We have previously reported the efficient production system for recombinant L proteins (as L particles) in yeast cells and the immunological properties of L particles in mice [21, 22]. Intraperitoneal injection of L particles efficiently and simultaneously elicits anti-S, anti-pre-S2, and anti-pre-S1 antibodies. In addition, the anti-pre-S1 rabbit antibodies were found to recognize various segments of the pre-S1 region, including the pre-S1 (21-47) segment, which is indispensable for HBV infection. These results demonstrate the ability of L particles to induce all antibodies against HBV *env* proteins. Thus, HBsAg L particles have an important role in mass vaccination against HBV, as well as for people considered at high risk of the HBV infection, especially in developing countries.

Advances in recombinant DNA technology allowed us to generate a novel vaccine against emerging infectious diseases. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is one of the emerging viruses and has received much the attention from public [9, 31-33]. Among these studies focusing on this problem, several researchers developed a novel vaccine against HIV-1 [34, 35], which displays HIV envelope glycoproteins on the surface of HBsAg particles. While these glycoproteins *per se* induce a slow and weak immune response to HIV-1, this hybrid vaccine elicited stronger and more rapid humoral responses against both HIV-1 and HBV. Thus, HBsAg particles could boost the host immune responses as an adjuvant. Since we succeeded in producing the engineered particles displaying various molecules on the surface with the help of recombinant yeast cells, a hybrid vaccine displaying various foreign epitopes can be generated and might play an important role in mass vaccination against a number of infectious diseases.

HBsAg L PARTICLE FOR THE GENE THERAPY OF HEPATITIS B AND C

Because of the human liver-philic properties of L particles, viral hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma are the suitable targets for the L particle-mediated gene therapy. There are two strategies for the gene therapy of hepatitis B and C. One strategy, the immunological approach is a popular therapeutic method based on the stimulation of broad humoral and cellular immune responses to viral proteins. At present, vaccination for HBV is only the way to protect efficiently against HBV infection. Gene transfers of interferon (IFN)- α and/or IFN- γ genes [36-38] are the alternative approaches to vaccination. However, systemic administration of IFN is known to induce serious side effects in whole body, which limit broad usage of this IFN therapy.

Another strategy, the antiviral approach is designed to block the viral life cycle at several critical points. The molecular biological analysis of hepatitis viruses has led us to the identification of the appropriate targets for antiviral therapy [39]. Antisense oligonucleotides [40-45], antisense RNA [46-48] and ribozymes [49, 50] have demonstrated the

effective blockade of viral gene expression *in vitro*. Recently, several groups have demonstrated that RNAi is an attractive therapeutic tool for inhibiting viral replication [51-54]. RNAi is based upon the process of sequence-specific gene silencing using short interfering RNAs (siRNAs). The siRNAs, designed as sequences homologous to the viral genome, reduced the transcription of viral genes *in vivo* without affecting to the host cell.

Although the specific therapeutic genes appear to be effective in antiviral therapy, currently available vectors cannot deliver them to their targets in a pinpoint manner. Therefore, HBsAg L particle is considered to be applicable for both IFN treatment and antiviral therapy. According to our data, L particles can deliver these therapeutic materials efficiently into human hepatocytes by an intravenous injection.

Chronic infections of hepatitis B and C virus induce hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with high frequency. Numerous gene therapy strategies have been investigated for their potential in treating HCC. They include the suicide system, the genetic immunotherapy, and the gene replacement. The suicide system is considered as one of the most powerful approaches to cancer treatment. The tumor cells, to which suicide genes coding for enzymes that convert non-toxic compounds (prodrugs) into toxic products were introduced, can be readily eliminated upon the subsequent administration of prodrug. Many suicide gene therapies have been successfully used in animal models of cancer. The most potent and widely used gene is the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-*tk*) [55, 56]. Since all cells transfected with HSV-*tk* gene are killed by the administration of HSV-*tk*-specific inhibitor, gancyclovir (GCV), it is necessary to achieve the cancer cell-specific expression of HSV-*tk* gene. For this purpose, the tissue-specific and the cell-specific promoters/enhancers were considered suitable for the *in vivo* targeting. Most widely used promoter/enhancer is derived from the α -fetoprotein (AFP) gene, of which the protein is produced only in the fetal liver but reproduced in large parts of HCC patients [57, 58]. Thus, AFP promoter has been expected promising for the gene therapy of HCC [59-61]. Combination with L particles might further reduce the side effect of gene therapy in tissues other than liver, and change from surgical operation to intravenous injection for the administration of therapeutic genes. It is also important to achieve the high cell specificity by dual mechanisms, inside promoter and outside cell-recognition molecule. Since 30-40% of HCC patients are non- or low-AFP producing, it is necessary to establish novel *in vivo* targeting system for all types of HCC. For examples, the L particles displaying HCC-specific antibodies and the L particles displaying dual cell-recognition molecules (EGF and wild type pre-S1 peptide), which we recently developed, are highly promising.

CONCLUSION

Based on the HBsAg L particle, we have succeeded in generating the platform technology for *in vivo* pinpoint delivery system. This system is applicable for not only genes but also drugs and proteins. Since the HBsAg S/M particles had already been developed as a recombinant HB vaccine in

the last decade, the HBsAg L particle is considered to be essentially safe in human. This system firstly facilitates the *in vivo* pinpoint delivery of genes and drugs to the desired tissues and cells, the repetitive administration without surgical operation, and the use of large size of therapeutic gene. The treatments of liver diseases (e.g., viral hepatitis, cirrhosis, and HCC) with HBsAg L particle-mediated drug delivery are in the preclinical stage, which will move into the phase I clinical trial within several years. We believe this technology will be adopted by many forthcoming high-tech medicines.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. Thierry VandenDriecche, Prof. Marinee Khim Chuah, Prof. Toshihide Okajima, Prof. Kenji Tatematsu, and Prof. Hiroko Tada for their valuable advices, Dr. Hidehiko Iwabuki, Dr. Yasushi Iwasaki, Mr. Shunpei Furomitsu, Mr. Kazumasa Fukao, Mr. Ken Kishigami, Ms. Mana Idoi, and Ms. Setsuko Nagao for their technical contributions.

REFERENCE

- [1] Verma, I.M.; Somia, N. *Nature*, 1997, 389, 239.
- [2] Friedmann, T. *Nat. Med.*, 1996, 2, 144.
- [3] Muul, L.M.; Tuschong, L.M.; Soenen, S.L.; Jagadeesh, G.J.; Ramsey, W.J.; Long, Z.; Carter, C.S.; Garabedian, E.K.; Alleyne, M.; Brown, M.; Bernstein, W.; Schurman, S.H.; Fleisher, T.A.; Leitman, S.F.; Dumber, C.E.; Blaese, R.M.; Candotti, F. *Blood*, 2003, 101, 2563.
- [4] Cavazzana-Calvo, M.; Hacein-Bey, S.; de Saint Basile, G.; Gross, F.; Yvon, E.; Nusbaum, P.; Selz, F.; Hue, C.; Certain, S.; Casanova, J.L.; Bousso, P.; Deist, F.L.; Fischer, A. *Science*, 2000, 288, 669.
- [5] Candotti, F.; Blaese, R.M. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1998, 19, 493.
- [6] McTaggart, S.; Al-Rubeai, M. *Biotechnol. Adv.* 2002, 20, 1.
- [7] St. George, J.A. *Gene Ther.*, 2003, 10, 1135.
- [8] Shand, N.; Weber, F.; Mariani, L.; Bernstein, M.; Gianella-Borradori, A.; Long, L.; Sorensen, A.G.; Barbier, N. *Hum. Gene Ther.*, 1999, 10, 2325.
- [9] Riddell, S.R.; Elliott, M.; Lewinsolin, D.A.; Gilbert, M.J.; Wilson, L.; Manley, S.A.; Lupton, S.D.; Overell, R.W.; Reynolds, T.C.; Corey, L.; Greenberg, P.D. *Nat. Med.*, 1996, 2, 216.
- [10] Powell, J.S.; Ragni, M.V.; White, G.C. 2nd.; Lusher, J.M.; Hillman-Wiseman, C.; Moon, T.E.; Cole, V.; Ramanathan-Girish, S.; Rochil, H.; Sajjadi, N.; Jolly, D.J.; Hurst, D. *Blood*, 2003, 102, 2038.
- [11] Ailles, L.E.; Humphries, R.K.; Thomas, T.E.; Hogge, D.E. *Exp. Hematol.*, 1999, 27, 1609.
- [12] Li, Z.; Dullmann, J.; Schiedlmeier, B.; Schmidt, M.; von Kalle, C.; Meyer, J.; Forster, M.; Stocking, C.; Wahlers, A.; Frank, O.; Osterlag, W.; Kuhlke, K.; Eckert, H.G.; Fehse, B. *Science*, 2002, 296, 497.
- [13] Marshall, E. *Science*, 2002, 298, 34.
- [14] Marshall, E. *Science*, 2003, 299, 520.
- [15] Heermann, K.H.; Goldmann, U.; Schwartz, W.; Seyffarth, T.; Baumgarten, H.; Gerlich, W.H. *J. Virol.*, 1984, 52, 396.
- [16] Tiollais, P.; Pourcel, C.; Dejean, A. *Nature*, 1985, 317, 489.
- [17] Neurath, A.R.; Kent, S.B. *Adv. Virus Res.*, 1988, 34, 65.
- [18] Neurath, A.R.; Kent, S.B.; Strick, N.; Parker, K. *Cell*, 1986, 46, 429.
- [19] Pontisso, P.; Pivoletto, M.G.; Gerlich, W.H.; Heermann, K.H.; Bardini, R.; Alberti, A. *Virology*, 1989, 173, 522.
- [20] De Meyer, S.; Gong, Z.J.; Suwandhi, W.; van Pelt, J.; Soumillion, A.; Yap, S.H. *J. Viral. Hepat.*, 1997, 4, 145.
- [21] Kuroda, S.; Otaka, S.; Miyazaki, T.; Nakao, M.; Fujisawa, Y. *J. Biol. Chem.*, 1982, 267, 1953.
- [22] Yamada, T.; Iwabuki, H.; Kanno, T.; Tanaka, H.; Kawai, T.; Fukuda, H.; Kondo, A.; Seno, M.; Tanizawa, K.; Kuroda, S. *Vaccine*, 2001, 19, 3154.
- [23] Yamada, T.; Iwasaki, Y.; Tada, H.; Iwabuki, H.; Chuah, M.K.; VandenDriessche, T.; Fukuda, H.; Kondo, A.; Ueda, M.; Seno, M.; Tanizawa, K.; Kuroda, S. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21, 885.
- [24] Marion, P.L.; Salazar, F.H.; Alexander, J.J.; Robinson, W.S. *J. Virol.*, 1979, 32, 796.
- [25] Milich, D.R. *Viral Immunol.*, 1987, 1, 83.
- [26] Neurath, A.R.; Seto, B.; Strick, N. *Vaccine*, 1989, 7, 234.
- [27] D' Mello, F.; Partidos, C.D.; Steward, M.W.; Howard, C.R. *Virology*, 1997, 237, 319.
- [28] Le Seyec, J.; Choutau, P.; Cannie, I.; Guguen-Guillouzo, C.; Gripon, P. *J. Virol.*, 1999, 73, 2052.
- [29] Petit, M.A.; Strick, N.; Dubanchet, S.; Capel, F.; Neurath, A.R. *Mol. Immunol.*, 1991, 28, 517.
- [30] Raz, R.; Koren, R.; Bass, D. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2001, 3, 328.
- [31] Wong-Staal, F.; Poeschla, E.M.; Looney, D.J. *Hum. Gene Ther.*, 1998, 9, 2407.
- [32] Marasco, W.A.; Chen, S.; Richardson, J.H.; Ramstedt, U.; Jones, S.D. *Hum. Gene Ther.*, 1998, 9, 1627.
- [33] Donners, H.; Vermoesen, T.; Willems, B.; Davis, D.; van der Groen, G. *Vaccine*, 2003, 22, 104.
- [34] Fomsgaard, A.; Nielsen, H.V.; Bryder, K.; Nielsen, C.; Machuga, R.; Bruun, L.; Hansen, J.; Buus, S. *Scand J. Immunol.*, 1998, 47, 289.
- [35] Bryder, K.; Sbai, H.; Nielsen, H.V.; Corbet, S.; Nielsen, C.; Whalen, R.G.; Fomsgaard, A. *DNA Cell Biol.*, 1999, 18, 219.
- [36] Fuchizaki, U.; Kaneko, S.; Nakamoto, Y.; Sugiyama, Y.; Imagawa, K.; Kikuchi, M.; Kobayashi, K. *J. Med. Virol.*, 2003, 69, 188.
- [37] Chiou, H.C.; Lucas, M.A.; Coffin, C.C.; Banaszczuk, M.G.; III, C.R.; Lollo, C.P. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2001, 1, 629.
- [38] Weng, H.L.; Cai, W.M.; Liu, R.H. *World J. Gastroenterol.*, 2001, 7, 42.
- [39] Weizsacker, F.V.; Wieland, S.; Kock, J.; Offensperger, W.; Offensperger, S.; Moradpour, D.; Blum, H.E. *Hepatology*, 1997, 26, 251.
- [40] Blum, H.E.; Galun, E.; Weizsacker, F.V.; Wands, J.R. *Lancet*, 1991, 337, 1230.
- [41] Wu, G.Y.; Wu, C.H. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 12436.
- [42] Yao, Z.Q.; Zhou, Y.X.; Guo, J.; Feng, Z.H.; Feng, X.M.; Chen, C.X.; Jiao, J.Z.; Wang, S.Q. *Acta Virol.*, 1996, 40, 35.
- [43] Mizutani, T.; Kato, N.; Hirota, M.; Sugiyama, K.; Murakami, A.; Shimotohno, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, 212, 906.
- [44] Zhang, H.; Hanecak, R.; Brown-Driver, V.; Azad, R.; Conklin, B.; Fox, M.C.; Anderson, K.P. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, 43, 347.
- [45] Wu, G.Y.; Walton, C.M.; Wu, C.H. *Croat. Med. J.*, 2001, 42, 463.
- [46] McCaffrey, A.P.; Meuse, L.; Pham, T.T.; Conklin, D.S.; Hannon, G.J.; Kay, M.A. *Nature*, 2002, 418, 38.
- [47] Shlomai, A.; Shaul, Y. *Hepatology*, 2003, 37, 764.
- [48] Zu Pullnitz, J.; Wieland, S.; Blum, H.E.; Wands, J.R. *Gastroenterology*, 1998, 115, 702.
- [49] Feng, Y.; Kong, Y.Y.; Wang, Y.; Qi, G.R. *Biol. Chem.*, 2001, 382, 655.
- [50] Lieber, A.; He, C.Y.; Polyak, S.J.; Gretch, D.R.; Barr, D.; Kay, M.A. *J. Virol.*, 1996, 70, 8782.
- [51] McCaffrey, A.P.; Nakai, H.; Pandey, K.; Huang, Z.; Salazar, F.H.; Xu, H.; Wieland, S.F.; Marion, P.L.; Kay, M.A. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21, 639.
- [52] Hamazaki, K.; Nakao, K.; Matsumoto, K.; Ichikawa, T.; Ishikawa, H.; Eguchi, K. *FEBS Lett.* 2003, 543, 51.
- [53] Kapadia, S.B.; Brideau-Andersen, A.; Chisari, F.V. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 2014.
- [54] Yokota, T.; Sakamoto, N.; Enomoto, N.; Tanabe, Y.; Miyagishi, M.; Maekawa, S.; Yi, L.; Kurosaki, M.; Taira, K.; Watanabe, M.; Mizusawa, H. *EMBO Rep.*, 2003, 4, 602.
- [55] Singhal, S.; Kaiser, L.R. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, 1998, 7, 505.
- [56] Connors, T.A. *Gene Ther.*, 1995, 2, 702.
- [57] Colombo, M. *J. Hepatol.*, 1992, 15, 225.
- [58] Saio, Y.; Nakata, K.; Kato, Y.; Shima, M.; Ishii, N.; Koji, T.; Taketa, K.; Endo, Y.; Nagataki, S. *N. Engl. J. Med.*, 1993, 328, 1802.
- [59] Mawatari, F.; Tsuruta, S.; Ido, A.; Ueki, T.; Nakao, K.; Kato, Y.; Tamaoki, T.; Ishii, N.; Nakata, K. *Cancer Gene Ther.*, 1998, 5, 301.

[60] Bui, L.A.; Butterfield, L.H.; Kim, J.Y.; Ribas, A.; Seu, P.; Lau, R.; Glaspy, J.A.; McBride, W.H.; Economou, J.S. *Hum. Gene Ther.*, 1997, 8, 2173.

[61] Kaneko, S.; Hallenbeck, P.; Kotani, T.; Nakabayashi, H.; McGarrity, G.; Tamaoki, T.; Anderson, W.F. *Cancer Res*, 1995, 55, 5283.

The specific delivery of proteins to human liver cells by engineered bio-nanocapsules

Dongwei Yu¹, Chie Amano¹, Takayuki Fukuda^{1,2}, Tadanori Yamada³, Shun'ichi Kuroda^{3,4}, Katsuyuki Tanizawa^{3,4}, Akihiko Kondo^{4,5}, Masakazu Ueda^{4,6}, Hidenori Yamada¹, Hiroko Tada¹ and Masaharu Seno^{1,4,7}

1 Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Japan

2 Kobe R & D Center, Katayama Chemical Industries Co. Ltd, Kobe, Japan

3 Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Japan

4 Research and Development Division, Beacle, Inc., Okayama, Japan

5 Faculty of Engineering, Kobe University, Japan

6 Keio University, School of Medicine, Tokyo, Japan

7 Research Center for Biomedical Engineering, Okayama University, Japan

Keywords

bio-nanocapsule; L fusion protein; protein delivery vector; specific infection; topology

Correspondence

M. Seno, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, 3.1.1 Tsushima-Naka, Okayama 700-8530, Japan
Tel/Fax: +81 86 251 8216
E-mail: mseno@cc.okayama-u.ac.jp

(Received 20 March 2005, revised 9 May 2005, accepted 24 May 2005)

doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04790.x

A bio-nanocapsule (BNC), composed of the surface antigen (sAg) of the hepatitis B virus, is an efficient nanomachine with which to accomplish the liver-specific delivery of genes and drugs. Approximately 110 molecules of sAg are associated to form a BNC particle with an average diameter of 130 nm. The L protein is an sAg peptide composed mainly of preS and S regions. The preS region, with specific affinity for human hepatocytes, is localized in the N-terminus. The S region following the preS has two transmembrane regions responsible for the formation of particles. In this study, the fusion of emerald green fluorescent protein (EGFP) at the C-terminus of the S region was designed to deliver proteins to human hepatocytes. Truncation of the C-terminus of the S region was required to obtain sufficient expression levels in Cos7 cells. The nanoparticles that were produced delivered EGFP to human hepatoma cells, displaying the EGFP moiety outside, or enclosing it inside. However, only a single orientation characterizes the particle, so that either type of L fusion particle could be effectively and independently separated by an antibody affinity column. The dual C-terminal topologies of the L fusion particles designed in this study could be applied to various proteins for the C-terminal moiety of the L fusion proteins, depending on the character of the proteins, such as cytoplasmic proteins, as well as cytokines or ligands to cell surface receptors. We suggest that this fusion design is the most efficient way to prepare a BNC that delivers proteins to specific cells or tissues.

A drug and gene delivery system has long been considered important for drug discovery and pharmaceutical development. In particular, the establishment of a cell- or tissue-specific targeting method is the latest area of focus. Although, viral vectors, such as those utilizing

adenovirus or adeno-associated virus, have been developed for gene therapy, the cell specificity must be ameliorated. Some other problems, such as inflammation, neutralizing antibodies, the dangers of mass production, and insertional mutagenesis, limit the use of

Abbreviations

BNC, bio-nanocapsule; DDS, drug delivery system; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EGFP, emerald green fluorescent protein; ER, endoplasmic reticulum; FBS, fetal bovine serum; HBV, hepatitis B virus; IFN, interferon; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; sAg, surface antigen.

viral vectors in humans. By contrast, liposomes as a drug delivery vector have no limits to mass production and do not have the drawbacks of viral vectors. However, liposomes have a lower transfection efficiency and cell/tissue specificity compared with viral vectors, even though they have the ability to transfer proteins into cells. To find a material that has good transfection efficiency free from the hazards of viral infection, we come up with the idea of using a hollow particle derived from recombinant viral envelope proteins. The hepatitis B virus (HBV) is a human liver-specific virus whose 3.2-kb genome codes three envelope proteins in a single open reading frame (ORF). These encoded surface antigens (sAgs) are called small (S), medium (M) and large (L) proteins [1]. In 1982, Valenzuela *et al.* succeeded in preparing recombinant sAg from yeast as S protein particles with a diameter of 22 nm [2]. Around 1990, recombinant L proteins were also found to be produced in yeast cells as hollow virus-like particles and were developed as immunogens for hepatitis B vaccines, which were proven safe for use in humans [3,4]. The recombinant L proteins formed a virus-like particle with a diameter of approximately 200 nm when produced in *Saccharomyces cerevisiae* [3,5]. We reported that this particle was extremely useful as a vector to target human hepatocyte *in vivo* exploiting the character of infectivity of HBV limited to human liver [6]. Because this recombinant particle is empty, we named this hollow nanoparticle a bio-nanocapsule (BNC) as it represents an efficient nanomachine for achieving liver-specific delivery of genes and drugs.

Although electroporation is proposed as a convenient procedure for enclosing substances in the particle [6], fusion to the C-terminus of L protein appears to be the most efficient way to prepare a BNC to convey foreign proteins. Thus, fusing a suitable protein to the tail should be a convenient way of preparing a BNC that delivers proteins to human hepatocytes.

Results

Evaluation of hepatitis B L fusion particles

The HBV L envelope protein is composed of three major regions. The preS1 region of 108 or 119 amino acids at the N-terminus directly recognizes human hepatocytes [1,7–9]. The preS2 region of 55 amino acids following the preS1 region has an affinity with polymerized albumin-mediated interactions. The major 226 amino acids of the S region occupy the C-terminal half of the L protein. Current models for the transmembrane structure of the S region assume that both the N- and C-termini are at external positions in mature

particles [10,11]. Although it is predicted that four transmembrane-like α helices are present in the S region, only the two in the N-terminus have been shown to be transmembrane helices [12–14]. These two domains, which correspond to amino acids 8–22 and 80–98, respectively, are separated by a hydrophilic region that is exposed to the internal side of the mature particle. The C-terminal topology of the S region has not been challenged experimentally and remains to be investigated [12,15], whereas the preS region has been shown to protrude into the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) [16]. To enclose protein inside the BNC, we designed emerald green fluorescent protein (EGFP) fusion at the C-terminus of the S region, with or without truncation, using 32, 45 and 54 amino acid residues from the C-terminus, respectively, to obtain four types of L fusion particles, L-FLAG-EGFP, L(Δ 32)-FLAG-EGFP, L(Δ 45)-FLAG-EGFP and L(Δ 54)-FLAG-EGFP, with an intervening sequence of FLAG-tag (Fig. 1). Truncations were designed to shorten the C-terminus as much as possible for a single transmembrane spanning region. Because proline often functions as a helix disruptor, the proline residues at 177 and 187 are considered in the truncation.

According to the amino acid sequence, the molecular mass of L-FLAG-EGFP, which is the fusion protein between the full length of the L protein and EGFP, is calculated to be 68.5 kDa. The apparent molecular mass of L-FLAG-EGFP is 71.5 kDa due to the glycosylated Asn146 in the S region on SDS/PAGE [15,17]. Taking the sizes of C-terminal truncation into account, the molecular mass of each L(Δ 32)-FLAG-EGFP, L(Δ 45)-FLAG-EGFP and L(Δ 54)-FLAG-EGFP is calculated to be 68, 66.5 and 65.7 kDa, respectively.

These L proteins fused to EGFP were transiently expressed in Cos7 cells (Fig. 2A). During the culturing period, EGFP fluorescence was observed from the transfected Cos7 cells along the ER and Golgi, but not in the nuclei, indicating that the fused protein was produced in the secretory path. Fusion proteins were detected with both anti-S and anti-GFP IgG in the cell lysates of transfected cells by western blotting at their expected sizes, as calculated (Fig. 2B). Immunoprecipitates of the conditioned media, with either anti-S, anti-FLAG or anti-GFP IgG, showed bands of fusion proteins, in addition to those in the cell lysates (Fig. 2C). Secretion of L-FLAG-EGFP and L(Δ 54)-FLAG-EGFP from Cos7 cells appeared limited, although it was, in fact, produced in sufficient quantity. Expression and secretion of L(Δ 32)-FLAG-EGFP were both low. Secretion of L(Δ 45)-FLAG-EGFP was obviously the highest of the four fusion constructs.

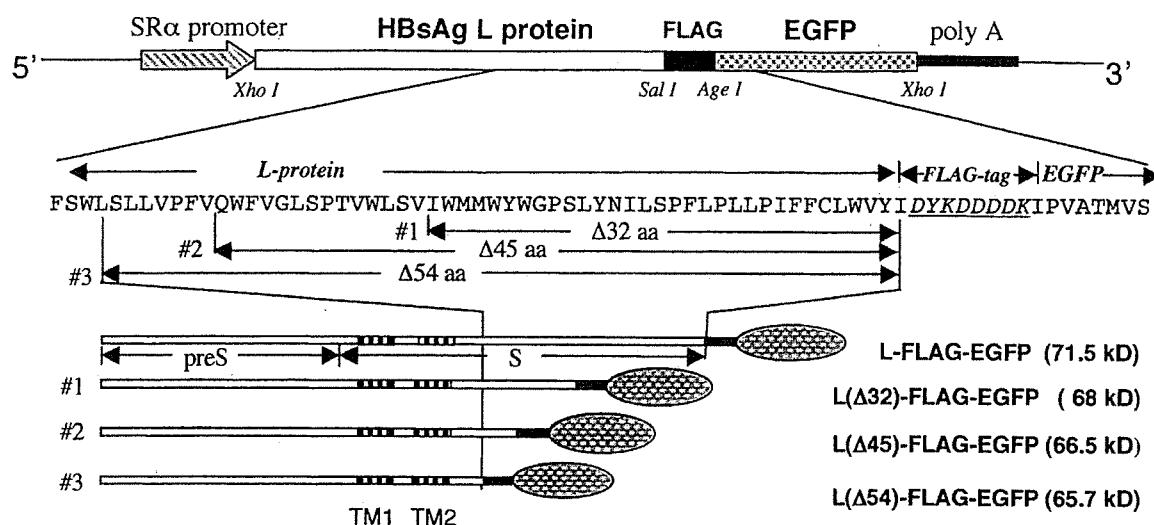


Fig. 1. Fusion proteins between L and EGFP. The 720 bp *egfp* gene was ligated to the 3' side of the L gene of the hepatitis B virus flanking a 39 bp FLAG as a spacer sequence in an open reading frame. The resultant gene coding L-FLAG-EGFP was inserted downstream of a SRα promoter. The C-terminus of the L protein was truncated by 32 (96 bp), 45 (135 bp) and 54 amino acid residues (162 bp) to optimize expression of the L fusion protein. The resultant fusion proteins are designated as L-FLAG-EGFP, L(Δ32)-FLAG-EGFP, L(Δ45)-FLAG-EGFP, and L(Δ54)-FLAG-EGFP. TM1 and TM2 represent transmembrane regions of the L protein.

The conditioned media were further assessed for the secretion of these different constructs of particles using enzyme immunoassay and fluorescence (Fig. 3). When the level of L-FLAG-EGFP was considered to be 100%, that of L(Δ45)-FLAG-EGFP was > 300% in EIA. The fluorescence from the EGFP moiety of L fusion protein showed that L(Δ45)-FLAG-EGFP was secreted at the highest ratio. The analyses revealed that L(Δ45)-FLAG-EGFP was suitably optimized for production as the fusion protein.

L(Δ45)-FLAG-EGFP particle formation was assessed by sucrose gradient ultracentrifugation (Fig. 4). When cell extracts were subjected to ultracentrifugation, both fluorescence and immunoreactivity were seen in the same fraction at a density of 1.11 g mL^{-1} , whereas the native EGFP fluorescence peak was found to have a density of 1.05 g mL^{-1} . Peak fractions were analyzed by western blotting to confirm the presence of fusion protein at 66.5 kDa. The density of the particles obtained from both cell extracts and the conditioned media was equivalent to that of the BNC. Whether from the conditioned media or the cell extracts, L(Δ45)-FLAG-EGFP has the potential to form a particle.

Topology analysis of the C-terminus of L fusion protein

Consisting of 56 amino acids, the primary structure of the C-terminus of the S region is rich in hydrophobic residues. Therefore, the computer-assisted prediction

assumes that there should be two α helices, which traverse the ER membrane twice [11,18]. In this context, EGFP fused to L protein with an intervening FLAG sequence may provide an excellent means of judging the C-terminal topology. Because L-FLAG-EGFP could be immunoprecipitated by anti-FLAG and anti-GFP IgG (Fig. 2C), the L protein C-terminus should be located on the external side of the particle. This is consistent with results reported by Eble *et al.* [12].

Because generation of its fluorophore depends on the correct formation of a tertiary structure and can easily be detected by fluorescence microscopy, EGFP has quickly become a powerful research tool for gene expression and subcellular protein localization in living cells and organisms. It was useful in this study, not only to estimate the level of L-EGFP fusion protein expression, but also to observe the infection of EGFP, chromophores are insulated by tightly woven barrel formations of β sheets, which offer strong resistance against proteolytic attack [19,20]. This resistance was confirmed by incubation with proteinase K at 60°C for 6 h (data not shown). As a result of this resistance, a convenient protease protection assay was available to determine the topology of the fused protein, as described below. However, slight digestion after 1 h of incubation was observed, indicating that the terminal sequences might be sensitive to proteinase K (Fig. 5).